



小型ピロプラズマ原虫実験感染牛の貧血に対するデキストラン鉄製剤の効果

著者	中村 義男, DORJEE Jambay, MUHINDO Jeanne Bukeya, KLINKHAJORN Anusorn, 金平 克史, 花房 泰子, 塩野 浩紀, 大田 方人, 神尾 次彦
雑誌名	動物衛生研究所研究報告
巻	116
ページ	1-10
発行年	2010-01-29
URL	http://doi.org/10.24514/00002271

doi: 10.24514/00002271

小型ピロプラズマ原虫実験感染牛の貧血に対する デキストラン鉄製剤の効果

中村義男^{1)*}, Jambay DORJEE²⁾, Jeanne Bukeka MUHINDO³⁾,
Anusorn KLINKHAJORN⁴⁾, 金平克史⁵⁾, 花房泰子¹⁾,
塩野浩紀⁶⁾, 大田方人⁷⁾, 神尾次彦⁵⁾

(平成 20 年 8 月 4 日 受付)

Effects of iron dextran on anemia in calves experimentally infected with *Theileria sergenti*

Yoshio NAKAMURA^{1)*}, Jambay DORJEE²⁾, Jeanne Bukeka MUHINDO³⁾,
Anusorn KLINKHAJORN⁴⁾, Katsushi KANEHIRA⁵⁾, Yasuko HANAFUSA¹⁾,
Hiroki SHIONO⁶⁾, Masato OHTA⁷⁾ & Tsugihiko KAMIO⁵⁾

小型ピロプラズマ病貧血に対するデキストラン鉄製剤（鉄剤）の効果を解析した。摘脾牛に原虫寄生赤血球を接種して感染させ、貧血経過、赤血球メトヘモグロビン濃度（MetHb、血液酸化指標）、血清鉄、エリスロポエチン濃度を測定した。原虫感染後 23～41 日に血球容積（PCV）が 20～25% となった時点で、投与群に鉄剤 1g を 3 日間、あるいは 10 日間筋肉内に投与する試験を個別に実施し、それぞれの非投与の対照群との比較を行った。その結果、3 日間投与試験では貧血経過に群間の差はみられなかった。しかしながら 10 日間投与試験では、貧血極期となった投与開始後 2～3 週の赤血球数、および貧血回復期である投与開始後 6～8 週の PCV およびヘモグロビン濃度が投与群で大きかった。MetHb は両群同様の一過性増加を示し、投与群特有の増加はみられなかった。血清鉄濃度は投与開始後 1 週と 7～10 週に投与群で大きかった。血清エリスロポエチン濃度は両群で貧血進行期に同様に増加した。これらの結果から、原虫実験感染牛の貧血進行期に鉄剤を 10 日間投与することにより、貧血極期の赤血球数減少の緩和と貧血回復期の PCV およびヘモグロビン濃度の改善に効果があることが検証された。

-
- 1) 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム
 - 2) Regional Veterinary Laboratory (Khaling), Bhutan
 - 3) Kamungu District Station, Ministry of Agriculture, Animal Industry and Fisheries, Uganda
 - 4) Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand
 - 5) 動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム
 - 6) 食品・産業技術総合研究機構 総合企画調整部（現：動物衛生研究所 環境・常在疾病研究チーム）
 - 7) 動物衛生研究所 次世代製剤開発チーム

- Thailand
- 5) Research Team for Zoonotic Diseases, National Institute of Animal Health
- 6) Department of Research Planning and Coordination, National Agriculture and Food Research Organization (present: Research Team for Environmental/Enzootic Diseases, National Institute of Animal Health)
- 7) Research Team for Advanced Biologicals, National Institute of Animal Health

-
- 1) Research Team for Bacterial/Parasitic Diseases, National Institute of Animal Health
 - 2) Regional Veterinary Laboratory (Khaling), Bhutan
 - 3) Kamungu District Station, Ministry of Agriculture, Animal Industry and Fisheries, Uganda
 - 4) Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,

* Corresponding author ; Yoshio NAKAMURA
Research Team for Bacterial/Parasitic Diseases, National
Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-0856, JAPAN
Tel : 029-838-7753
Fax : 029-838-7907
E-mail : yoshion@affrc.go.jp

緒 言

小型ピロプラズマ病は、小型ピロプラズマ原虫 *Theileria sergenti* の感染増殖によって引き起こされる貧血を主徴とする牛の疾病である^{10, 11)}。小型ピロプラズマ原虫は全国の放牧地等に分布するフタトゲチマダニによって主に媒介されるため、放牧牛への対策が重要である。1960年代に全国で牛の放牧地が造成、開発された時期には本病により各地の放牧牛に多大な損失がもたらされた^{8, 10, 11)}。

放牧期間を通しての衛生検査による感染発病状況の把握と対処、抗原虫薬アミノキノリン製剤の普及に加えて、1990年代に効果的なポアオン方式の殺ダニ薬フルメトリン製剤が登場したことにより、現在では小型ピロプラズマ病の多大な被害を被っている放牧地は多くはない^{19, 27)}。しかしながら、2000年における放牧場の実態調査では、全国3割の放牧場で本病の発生が確認されている³³⁾。また、全国5割の放牧場で定期衛生検査が、8割の放牧場でフルメトリン製剤を用いるダニ対策が実施されており、本病の防除のために多大な労力と経費が払われている³³⁾。2005年3月に専用治療薬であるアミノキノリン製剤の製造が中止となり、今後の治療対策に不安が残された。温暖化やシカ等の野生動物の侵入増加にともない放牧地に原虫媒介ダニが増加するとの懸念や、フルメトリン製剤に対する耐性獲得ダニがいずれは出現する可能性があることから、小型ピロプラズマ病の発生リスクは今後増加するものと考えられる。また、水田跡地や耕作放棄地等が新規放牧地として各地で活用され始めているが、それらの場所ではダニの生息状況が把握されていないことから、導入牛の衛生管理をより適正に行わないと本病の発生地となる危険がある。

小型ピロプラズマ病に罹患した牛の病勢は、血液中における原虫の増殖程度ではなく、貧血の程度に依存することが経験的に知られてきた^{9, 14)}。すなわち、原虫の増殖程度が顕著でなくても貧血が重度に進行する場合は牛の予後が悪い。この点から、原虫感染そのものを阻止できなくても、感染牛に生じる貧血を軽減できれば損耗が軽減され回復が早まることが期待される。本病の発生最盛期である1960年代に、原虫汚染放牧地における抗原虫薬とデキストラン鉄製剤の3日間同時投与試験が実施され、抗原虫薬単独投与牛に比べて両製剤併用牛で貧血回復がより良好であったことが報告されている²⁶⁾。しかしながら、デキストラン鉄製剤単独投与の効果については調べられていない。

そこで、小型ピロプラズマ病貧血に対する市販デキス

トラン鉄製剤の効果について、原虫実験感染系で評価することを目的として、デキストラン鉄製剤を3日間および10日間連日投与する試験を実施した。

材料と方法

動物

15頭のホルスタイン種の雄子牛を使用した。これらの牛は栃木県内の一般農家で生産され、2～3か月齢まで牛舎内で飼育された。動物衛生研究所に搬入後は感染動物舎内で飼育された。これらのうち2頭は搬入前に小型ピロプラズマ原虫（鹿沼株、新里株と命名）に自然感染しており、感染血液供給牛として使用した。両牛の生産農家間の距離は約10kmであった。残りの13頭は感染試験開始の少なくとも3週間前までに摘脾を行い、定期血液検査により貧血あるいは原虫寄生がないこと、および酵素抗体法を用いる血清抗体検査¹⁸⁾で抗小型ピロプラズマ原虫抗体陰性を確認した。試験開始時の月齢は4～9か月であった。すべての牛は動物衛生研究所動物飼養管理要領に基づき飼育し、試験は同所動物実験倫理委員会の承認を受け（承認番号第667, 682, 805号）、同所動物実験要領に従い実施した。

小型ピロプラズマ原虫および試験牛への感染

試験は2回に分けて実施した。第1回目試験である3日間投与試験では、鹿沼株原虫自然感染牛を摘脾して原虫を増殖させ、摘脾後37日に赤血球数 $820 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、原虫寄生率16.9%となった時点でクエン酸ナトリウムを抗凝固剤として用いて頸静脈血を採取した。血液を $4^\circ\text{C} \cdot 1000\text{g} \cdot 15$ 分間遠心して上清および白血球層を吸引除去し、冷リン酸緩衝生理食塩液（PBS, pH7.2）を加えて原虫寄生赤血球数が $2 \times 10^6 / \mu\text{l}$ となるように赤血球浮遊液を調製した。第2回目試験である10日間投与試験では、新里株原虫自然感染牛を摘脾して原虫を増殖させ、摘脾後22日に赤血球数 $749 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、原虫寄生率15.5%となった時点で3日間投与試験時と同様の方法で赤血球浮遊液を調製した。両試験ともに、上記自然感染牛由来の各赤血球浮遊液25ml、原虫寄生赤血球数として 5×10^{10} 個を、各試験牛の頸部皮下に接種することにより感染を行った。

血液検査

感染後3か月間、頸静脈血をエチレンジアミン四酢酸二カリウム（EDTA）入り採血管およびブレイン採血管に採取した。全自動血球計数器（MEK-6358, 日本光電、

東京)を用いて EDTA 血の赤血球数, 血球容積, ヘモグロビン濃度, 平均赤血球容積 (MCV) を測定した。また, 常法により血液塗抹ギムザ染色標本を作製し, 原虫出現状況に応じて 1000 ～約 40000 個の赤血球を顕微鏡観察し, 原虫寄生赤血球数の百分率 (原虫寄生率) を算定した。血液検査の頻度は, 感染後 2 週からデキストラン鉄製剤投与開始日 (後述) までの期間は必要に応じて週 1 ～3 回, その他の期間は週 1 回とした。

赤血球メトヘモグロビン濃度 (MetHb)

血液の酸化傷害指標として MetHb を Evelyn & Malloy の方法⁴⁾を改良した方法で測定した。すなわち, EDTA 血 50 μ l を 0.02% サポニン加 1/60M リン酸緩衝液 (サポニン PB, pH 6.6) 5ml/に加えて溶血させ, 4°C・6 時間放置した。溶血液を 4 本の試験管 (#1 ～ #4) に各 1.2ml/分注した。試験管 #2 には 10% シアン化ナトリウム 5.6 μ l を, 試験管 #3 には 10% フェリシアン化カリウム 2 μ l を加えた。試験管 #4 には 10% フェリシアン化カリウム 2 μ l を加え, 5 分経過してからさらに 10% シアン化ナトリウム 5.6 μ l を加えた。試験管 #1 ～ #4 の試料各 1ml を光路長 10mm のメタクリル樹脂製キュベット (Semi-Micro Cuvette A-230, Spectrocell, フィラデルフィア) にとり, サポニン PB を対照として, 分光光度計 (UV-1200, 島津製作所, 京都) を用いて波長 630nm における吸光度 (順に $A_1 \sim A_4$) を測定した。MetHb を, $\text{MetHb}(\%) = (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4) \times 100$ で算出した。

血清検査

ブレイン採血管の血液は 6 時間室温で放置し, 1000g・15 分間遠心して血清を分離し, 使用まで -20°C 保存した。血清鉄濃度およびトランスフェリンの不飽和鉄結合能 (UIBC) をバソフェナントロリン直接法により, 生化学自動分析装置 (7020 形日立自動分析装置, 日立ハイテクノロジーズ, 茨城) および専用試薬 (L タイプワコー Fe, L タイプワコー UIBC, 和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した。血清エリスロポエチン濃度をラジオイムノアッセイキット (リコンビジェン EPO キット, ディーピーシーコーポレーション, 東京) を用いて測定した。測定標準にはキット付属の組換えヒトエリスロポエチンを使用した。

デキストラン鉄製剤および投与試験

デキストラン鉄製剤にはアイアン 100 (川崎三鷹製薬, 神奈川) を用いた。本剤 1ml/中には鉄として 100mg が

含まれる。原虫感染後 23 ～ 41 日に血球容積が 20 ～ 25% となった時点を投稿開始日 (投稿開始後 0 週) とし, その基準日から 3 日間投稿と試験ではデキストラン鉄製剤を 3 頭に 3 日間投与し, 3 頭を非投与の対照とした。10 日間投稿と試験ではデキストラン鉄製剤を 4 頭に 10 日間投与し, 3 頭を非投与の対照とした。デキストラン鉄製剤の投与は, 10ml/ (鉄として 1g) を 1 日 1 回臀部筋肉内に左右交互に実施した。投稿開始日からの時間経過を投稿開始後週数として表した。デキストラン鉄製剤の投与時および投与以降の疼痛感や腫脹, ふるえ等, デキストラン鉄製剤投与に由来すると考えられる臨床的な副作用所見の有無を観察した。各測定項目について, 投与群と対照群の平均値の群比較を分散分析により行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

剖 検

試験牛に 2% キシラジン液 (セラクター 2% 注射液, バイエルメディカル, 東京) 8ml/を頸静脈内投与した後, 頸動脈からの全放血を行った。デキストラン鉄製剤投与部位および主要臓器の肉眼病変の有無を観察した。

結 果

3 日間投稿と試験

3 頭の 3 日間投稿と牛へのデキストラン鉄製剤投稿開始日は感染後 37, 37, 41 日, 3 頭の対照牛の相同する基準日は感染後 31, 37, 41 日であった。それらの群の感染経過を Fig.1 に示す。原虫寄生率の推移は両群で同様であった (Fig.1f)。各採材日における赤血球数 (Fig.1a), 血球容積 (Fig.1b), ヘモグロビン濃度 (データを示していない), MCV (Fig.1c) の両群平均値に差は検出されなかった。投与群において投稿開始後 1 週に血清鉄濃度が対照群に比べて大きく (Fig.1d), UIBC が小さかった (Fig.1e)。両群において貧血極期となった投稿開始後 2 週 (感染後 6 ～ 8 週) に MetHb が一過性に 10% を超えたが, 試験期間を通して投与群特有の増加は検出されなかった (データを示していない)。

デキストラン鉄製剤の投与期間中および以降に, すべての投与牛に臨床的副作用は観察されなかった。剖検時に投与部位付近の組織における色調等の変化や, 主要臓器における肉眼病変は観察されなかった。

10 日間投稿と試験

4 頭の 10 日間投稿と牛へのデキストラン鉄製剤投稿開始日は感染後 25 日, 3 頭の対照牛の相同する基準日は感

染後 23, 25, 25 日であった。それらの群の感染経過を Fig.2 および Fig.3 に示す。原虫寄生率の推移は両群で同様であった (Fig.2f)。投与群において貧血極期となった投与開始後 2～3 週に赤血球数が対照群に比べて約 $90 \times 10^4/\mu\text{l}$ 大きかった (Fig.2a)。その後は統計的差は検出されなかったが、同様の平均値差をともなう両群で赤血球数が増加した。投与群において貧血回復期である投与開始後 6～8 週に血球容積 (Fig.2b) およびヘモグロビン濃度 (Fig.2c) が、対照群に比べて順に 3.6～5.9%, 1.2～2.0g/dl 大きかった。投与開始後 2 週の MCV が、投与群に比べて対照群において大きかった (Fig.2d)。対照群の MCV はその後漸減した。血清エリスロポエチン濃度は両群で貧血進行期に一過性に増加した。試験期間を通して両群の平均値に差は検出されなかった (Fig.2e)。血清鉄濃度は貧血の進行にともない両群で増加し、投与群において投与開始後 1 週、および 7～10 週に対照群に比べて大きかった (Fig.3a)。血清鉄濃度の増加にともない UIBC が両群で 0 近くまで減少した。その後増加に転じたが、投与群では貧血回復期における血清鉄濃度の再増加にともない再減少し、投与開始後 7～10 週に対照群に比べて小さかった (Fig.3b)。MetHb は投与開始後 2 週 (感染後 5～6 週) に両群の平均値が一過性に 10% を超えた。試験期間を通して両群の平均値に差は検出されなかった (Fig.3c)。

デキストラン鉄製剤の投与時に特段の疼痛感を示す個体はなかった。投与牛の 1 頭に投与開始後 1～2 週にかけて投与部位の軽度腫脹がみられた。これを除きデキストラン鉄製剤投与に由来すると考えられる体調不良等の臨床的副作用は観察されなかった。剖検時に投与牛 2 頭において、投与部位の臀部筋肉の一部に軽度の黄色化がみられた。主要臓器における肉眼病変はいずれの牛にも観察されなかった。

考 察

原虫実験感染牛の貧血進行期にデキストラン鉄製剤を 3 日間投与する今回の試験では、貧血改善効果は確認されなかった。過去に報告された放牧牛を用いる抗原虫薬アミノキノリン製剤とデキストラン鉄製剤の 3 日間同時投与試験では、両製剤併用牛において投与開始後 3 週の赤血球数が抗原虫薬単独投与牛に比べて大きい成績が得られている²⁶⁾。両試験を単純に比較することはできないが、当該既報の試験では貧血発生要因である原虫に抗原虫薬が作用したことにより、3 日間のデキストラン鉄製剤投与でより良好な貧血改善に結びついたものと考えら

れる。

今回のデキストラン鉄製剤 10 日間投与試験においては、反復投与直後の貧血極期における貧血緩和 (赤血球数の維持) と、貧血回復期の回復亢進 (血球容積およびヘモグロビン濃度の改善) に効果があることが検証された。投与群の貧血軽減において貧血極期には赤血球数に、回復期には血球容積およびヘモグロビン濃度にみられた効果の時間的ずれについては以下のように考えられる。貧血極期には対照群で MCV がより大きいために赤血球数は小さくとも血球容積は投与群と差がなかった。また、本病の貧血経過において MCV 増減に連動して平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) が増減することから^{24, 25)}、貧血極期には対照群で MCH がより大きいために赤血球数は小さくともヘモグロビン濃度は投与群と差がなかった。貧血回復期には対照群の MCV が投与群と同じ値にまで減少していることから、統計的差は検出されていないが赤血球数の回復のよい投与群で血球容積およびヘモグロビン濃度が大きい結果となった。なお、10 日間投与群の貧血極期における MCV が対照群に比べて小さかった点は、投与群では新生赤血球の容積増加を亢進させる必要がより少なかったことを示すもので、その時期の赤血球数減少すなわち貧血の進行がより軽度であったことを裏づける事象と考えられる。また、今回の試験結果から、小型ピロプラズマ病の貧血進行期において造血ホルモンであるエリスロポエチン³⁾ の応答が作動していることが明らかにされた。

動物体内の鉄代謝はほぼ完全な閉鎖系で構成されており、飼料由来のわずかな量が小腸粘膜細胞から取り込まれ、わずかな量が小腸粘膜細胞の脱落により糞便とともに体外に排出される²³⁾。従って、新生動物を除き、鉄欠乏の大部分の原因は持続的出血である^{1, 23)}。貧血は赤血球の MCV を基に形態学的に分類される²⁸⁾。鉄欠乏性貧血の特徴は MCV が減少する小赤血球性貧血である^{1, 30)}。小型ピロプラズマ病における貧血は MCV が増大する大赤血球性貧血である^{24, 25)}。また、小型ピロプラズマ病では、赤血球の破壊は血管内溶血ではなく、網内系細胞による貪食と処理に委ねられる血管外溶血でなされるため、血色素尿症を発現しない^{10, 17, 24)}。これらのことから発病牛は総体的な鉄欠乏には陥っていない。それではなぜ外来性鉄となるデキストラン鉄製剤の投与が本病貧血の軽減に有効なのか、との疑問が生じた。

近年、ヘプシジンが鉄代謝を抑制的に調節する主要分子であり、炎症、微生物感染や鉄過剰状態の際に主に肝細胞で産生され、小腸における鉄吸収や、鉄貯蔵細胞で

ある網内系細胞からの鉄放出を抑制する結果、これらの疾病において貧血が発生あるいは継続することが、ヒトやマウスの試験系で明らかにされている^{5, 6, 7)}。ヘプシジンによる鉄調節系は牛においては検証されていないが、次の仮説が正しいとするならば上記の疑問を説明可能である。すなわち、(1) 小型ピロプラズマ病においてヘプシジン応答が誘導される結果鉄代謝が抑制を受け、崩壊した赤血球に由来する鉄の大部分が網内系細胞内に保留される。(2) 鉄循環を担うトランスフェリン鉄¹³⁾を利用する造血応答が作動しているが赤血球損失を補うには時間を要している。実際に、10日間投与試験対照群における貧血極期までのヘモグロビン濃度減少は5.8g/dlであった (Fig.2c)。ヘモグロビンは重量で0.334%の鉄を含むことから²³⁾、この間のヘモグロビン鉄の減少は19.4mg/dlとなる。その大部分が網内系細胞内に保留されるとすると、血清鉄は最大でも356 μ g/dlであるので (Fig.3a)、最大限利用しても不足分を補うには時間を要することが推察される。(3) そのような状況下に投与されたデキストラン鉄が骨髓において直接利用される、との仮説である。

デキストラン鉄は水酸化第二鉄と多糖類であるデキストランポリマーの複合体である¹³⁾。筋肉内に投与されたデキストラン鉄は、直接的に、あるいは網内系細胞への吸収を経て間接的に、デキストランとの複合体のままリンパ系に入り込む^{1, 13, 16, 31)}。次いで血流を介して各組織に移行し、ここで初めてデキストランから鉄が遊離する^{1, 13)}。すなわち、デキストラン鉄に含まれる鉄はトランスフェリン鉄とならなくとも各組織に到達することが可能である^{1, 13)}。また、リンパ系にすぐに入らない分子は注射部位付近の結合織に結合し、徐々に放出されて比較的長期間鉄の供給源となる^{1, 13, 16, 31)}。これらの性質を有するデキストラン鉄が新規造血に効率的に利用されたことが考えられる。今後、小型ピロプラズマ病の病態解明の一環として、牛のヘプシジン応答等に基づく鉄調節系について詳細に解析していく必要がある。

発病牛の血清鉄濃度およびトランスフェリンの鉄飽和率が増加することが報告されており²⁹⁾、今回の試験でも同様の結果が示された。今回の試験では、10日間投与群における血清鉄濃度は投与期間中と貧血回復期の二峰性に増加した。第1次の増加は、投与後すぐに吸収されリンパ系から血流にでてきたデキストラン鉄によるものと考えられる。一方、第2次の増加は、投与部位から徐々に放出されるデキストラン鉄も利用され貧血が改善されてきた結果、余剰となったデキストラン鉄由来の鉄がト

ランスフェリン鉄となって検出されたものと考えられる。デキストラン鉄の放出が貧血回復期まで持続して、血球容積とヘモグロビン濃度の改善に役立っていることも考えられる。子豚やヒトへのデキストラン鉄製剤の筋肉内投与により、少なくとも約2か月間は投与部位にデキストラン鉄の一部が保持されることが報告されている^{16, 31)}。

小型ピロプラズマ病貧血は、原虫寄生の有無に関わらず赤血球が酸化される結果、貪食による破壊処理が亢進することが発生機構の一因であることが明らかにされている^{20, 21, 22, 32)}。酸化作用に深く関わる活性酸素種が各種疾病の要因となることが認識されつつあるが、二価の遊離鉄は過酸化水素と反応して反応性が高い \cdot OHを生成することが知られている²⁾。しかしながら、血液の酸化傷害指標となるMetHbに投与群特有の増加が検出されなかったことから、投与したデキストラン鉄製剤による血液のさらなる酸化亢進はないものと考えられた。また、10日間投与群において感染回復期にみられた血清鉄の第2次増加期間にも、増加した鉄による血液の酸化亢進はないものと考えられた。

今回設定した実験感染系は放牧地等における自然感染系とはいくつかの相違点がある。すなわち、今回の試験では、牛は脾を摘出されており、比較的大量の原虫を感染血液の1回接種という方法で感染を成立させている。一方、野外では放牧ストレスのかかる環境下で、原虫保有ダニの吸血に際して少量の原虫が一定期間続けて牛の体内に侵入していると考えられる。今回の成績が状況の異なる野外感染にそのまま適用されるかについて、小型ピロプラズマ病が発生している放牧地でデキストラン鉄製剤の効果を検証する試験を重ねる必要がある。

デキストラン鉄製剤は畜産分野では、主に新生子豚の、また、新生子牛の鉄欠乏性貧血の改善薬として使用される^{1, 12, 13)}。国内でも数品目の注射剤が販売されており、豚、牛、羊、犬への使用が可能である。価格は鉄1gあたり50～100円程度と安価である。放牧地の自然感染系においてデキストラン鉄製剤の効果が期待される場合には、効率的な投与時期、投与回数の検討や、現在使用可能な代替抗原薬ジアミジン製剤との効果的な併用法の検討が必要となる。特に、デキストラン鉄製剤に原虫の感染増殖を抑える作用はないことに加えて、貧血発生の完全阻止は不可能であることから、野外では、殺ダニ対策やジアミジン製剤との併用により発病時の損耗を軽減させる補助的手法として、安価なデキストラン鉄製剤の応用が期待される。

野外使用における副作用や安全性については慎重に検討されるべきである。今回の試験でも一部に観察された投与部位における肉色の変化¹⁶⁾に加えて、牛乳への移行や胎児への影響を考慮しなければならない。また、鉄過剰状態では鉄利用細菌に対する感受性が高まることから、動物の進化過程で厳密な鉄調節系が構築されたと考えられている⁵⁾。新生子牛の貧血対策においてデキストラン鉄製剤を経口投与すると、腸内の鉄利用細菌群が活性化することが指摘されている¹⁵⁾。また、新生子牛へのデキストラン鉄製剤注射剤の使用に際しては、テトラサイクリン系抗生物質との併用が危険であることが指摘されている¹⁵⁾。放牧牛へのデキストラン鉄製剤の応用にあたっては、これらの面からの安全性についても十分に確認する必要がある。

謝 辞

本研究は2006年度動物衛生研究所所内プロジェクト研究、および2007年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（課題番号1910、農林水産省）の資金を受けて実施した。共著者JD, JBM, AKは2005年度あるいは2006年度JICA 集団獣医技術研究Ⅱコース研修員として本研究に参画した。試験牛の飼育管理および採材補助をしていただいた動物衛生研究所動物疾病対策センター実験動物管理科職員各位、および血清鉄濃度とUIBC測定にご協力いただいた同疾病診断室検査技術課大橋博検査技術専門員に深謝する。

引用文献

- 1) Adams, H.R.: Antianemic agents. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (Adams, H.R. ed.), 7th ed., 531-543, Iowa University Press, Ames(1995).
- 2) Biemond, P., Swaak, A.J.G., van Euk, H.G., et al.: Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. Free Radic. Biol. Med. 4, 185-198(1988).
- 3) Car, B.D.: Erythropoiesis and erythrokinetics. In: Schalm's Veterinary Hematology (Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. eds.), 5th ed., 105-109, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia(2000).
- 4) Evelyn, K.A. & Malloy, H.T.: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. Biol. Chem. 126, 655-662(1938).
- 5) Ganz, T.: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood. 102, 783-788(2003).
- 6) Ganz, T. & Nemeth, E.: Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. Biochim. Biophys. Acta 1763, 690-699(2006).
- 7) 菱川恭子, 岩井一宏: 鉄代謝研究の進歩と鉄不応性貧血・感染防御への関わり. 日本臨床免疫学会誌. 28, 372-380(2005).
- 8) 石原忠雄: 放牧衛生 (その1) 牧野の実態と放牧牛の衛生. 家畜診療. 15(通巻68), 3-15(1968).
- 9) 石原忠雄: タイレリア病. 最新家畜伝染病 (越智勇一監修). 656-666, 南江堂, 東京 (1970).
- 10) 石原忠雄: 日本における牛のバベシア病とタイレリア病. 家畜衛試研究報告. 62, 128-146(1971).
- 11) Ishihara, T. & Minami, T.: Bovine theileriasis and babesiosis in Japan. Proceedings of the First Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. 201-209(1977).
- 12) 岩尾 健: 黒毛和種子牛の生理的貧血と鉄剤の投与効果. 肉牛ジャーナル. 15, 39-43(2002).
- 13) Kaushansky, K. & Kipps, T.J.: Hematopoietic agents: Growth factors, minerals, and vitamins. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Brunton, L.L., Lazo, J.S. & Parker, K.L. eds.), 11th ed., 1433-1465, McGraw-Hill, New York(2006).
- 14) 前出吉光: 赤血球の疾病. 新獣医内科学 (村上大蔵編). 646-675, 文永堂出版, 東京 (1996).
- 15) 松本大策: さらによくなる子牛生産. 日本畜産振興会, 東京 (2002).
- 16) Miller, E.R., Ullrey, D.E., Brent, B.E., et al.: Effects of age of pig and form of parenteral iron upon tissue iron concentration and ham discoloration at slaughter. J. Am. Vet. Med. Assoc. 150, 735-741(1967).
- 17) Minami, T., Fujinaga, T., Furuya, K., et al.: Clinico-hematologic and serological comparison of Japanese and Russian strains of *Theileria sergenti*. Natl. Inst. Anim. Health Q. 20, 44-52(1980).
- 18) Shimizu, S., Suzuki, K., Nakamura, K., et al.: Isolation of *Theileria sergenti* piroplasms from

- infected erythrocytes and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *T. sergenti* infections. Res. Vet. Sci. 45, 206-212(1988).
- 19) Shimizu, S., Nojiri, K., Matsunaga, N., et al.: Reduction in tick numbers (*Haemaphysalis longicornis*), mortality and incidence of *Theileria sergenti* infection in field-grazed calves treated with flumethrin pour-on. Vet. Parasitol. 92, 129-138(2000).
 - 20) Shiono, H., Yagi, Y., Thongnoon, P., et al.: Acquired methemoglobinemia in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*. Vet. Parasitol. 102, 45-51(2001).
 - 21) Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., et al.: Oxidative damage and phosphatidylserine expression of red blood cells in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*. Parasitol. Res. 89, 228-234(2003).
 - 22) Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., et al.: The influence of oxidative bursts of phagocytes on red blood cell oxidation in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*. Free Radic. Res. 37, 1181-1189(2003).
 - 23) Smith, J.E.: Iron metabolism and its diseases. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Kaneko, J.J., ed.), 4th ed., 33-109, Academic Press, San Diego(1989).
 - 24) 高橋清志：牛の小型ピロプラズマの感染と免疫に関する研究．酪農学園大学紀要．6, 179-248(1976).
 - 25) 高橋清志：小型ピロプラズマ症．主要症状を基礎にした牛の臨床（其田三夫監修）．改訂増補第5版．12-16, デーリイマン，札幌(1989).
 - 26) 谷口隆一，岸 昊司，駒井義一，ほか：小型ピロプラズマ症の治療試験「デキストラン鉄応用の効果について－予報」．北獣会誌．8, 71-73(1964).
 - 27) 寺田 裕：放牧と小型ピロプラズマ病対策．動薬研究 63, 1-9(2006).
 - 28) Tvedten, H. & Weiss, D.J.: Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Schalm's Veterinary Hematology (Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. eds.), 5th ed., 143-150, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia(2000).
 - 29) Watanabe, K., Ozawa, M., Ochiai, H., et al.: Changes in iron and ferritin in anemic calves infected with *Theileria sergenti*. J. Vet. Med. Sci. 60, 943-947(1998).
 - 30) Watson, A.D.J. & Canfield, P.J.: Nutritional deficiency anemias. In: Schalm's Veterinary Hematology (Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. eds.), 5th ed., 190-195, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia(2000).
 - 31) Will, G.: The absorption, distribution and utilization of intramuscularly administered iron-dextran: A radio-isotope study. Br. J. Haematol. 14, 395-406(1968).
 - 32) Yagi, Y., Thongnoon, P., Shiono, H., et al.: Increase in oxidized proteins in *Theileria sergenti*-infected erythrocyte membrane. J. Vet. Med. Sci. 64, 623-625(2002).
 - 33) 山根逸郎：牛の放牧場の全国実態調査（2000年）報告書．動物衛生研究所（2002）.

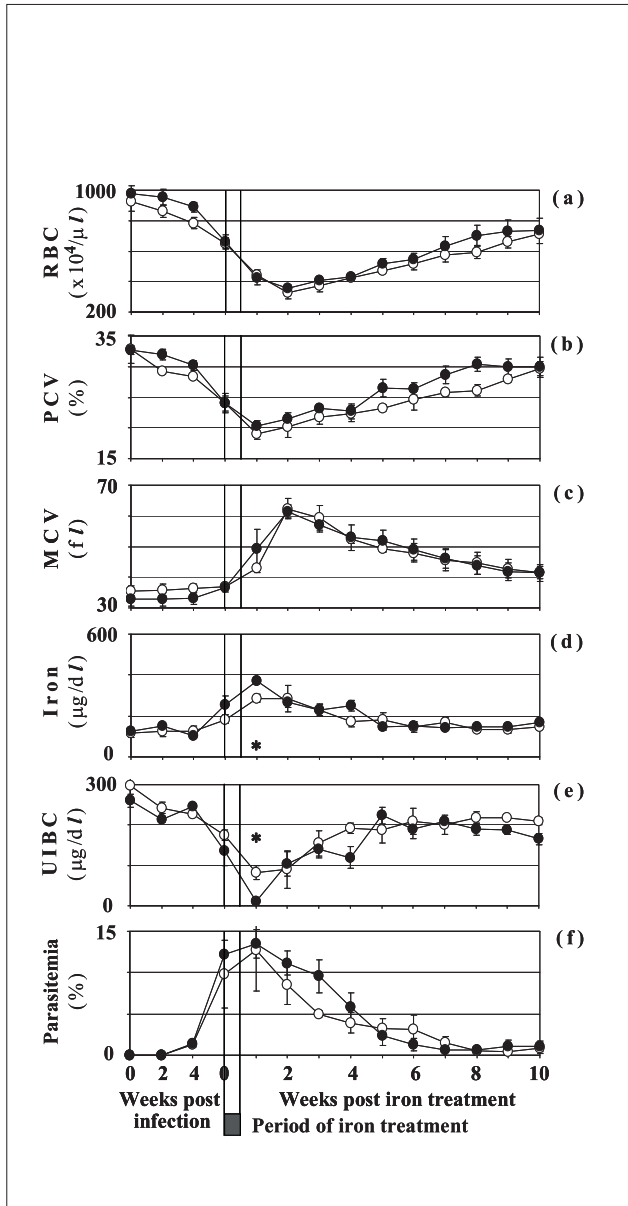


Fig.1 Erythrocyte numbers (RBC, a), packed cell volumes (PCV, b), mean corpus volumes of erythrocytes (MCV, c), serum iron concentrations (d), unsaturated iron binding capacity of serum transferrin (UIBC, e) and parasitemias (f) of *Theileria sergenti*-infected calves with 3-day treatment of iron dextran (closed circles, $n=3$) or with no treatment (open circles, $n=3$) in the 3-day treatment trial. Data show mean and standard error of three animals.

*: $p < 0.05$ between the groups.

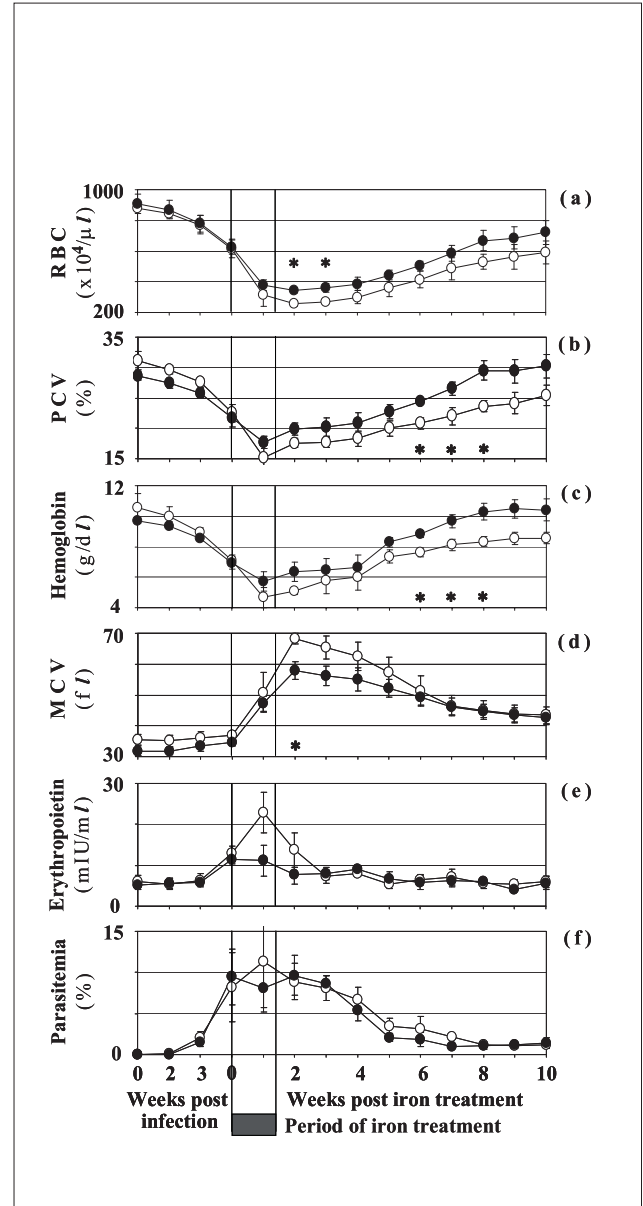


Fig.2 Erythrocyte numbers (RBC, a), packed cell volumes (PCV, b), hemoglobin concentrations (c), mean corpus volumes of erythrocytes (MCV, d), serum erythropoietin concentrations (e) and parasitemias (f) of *Theileria sergenti*-infected calves with 10-day treatment of iron dextran (closed circles, $n=4$) or with no treatment (open circles, $n=3$) in the 10-day treatment trial. Data show mean and standard error.

*: $p < 0.05$ between the groups.

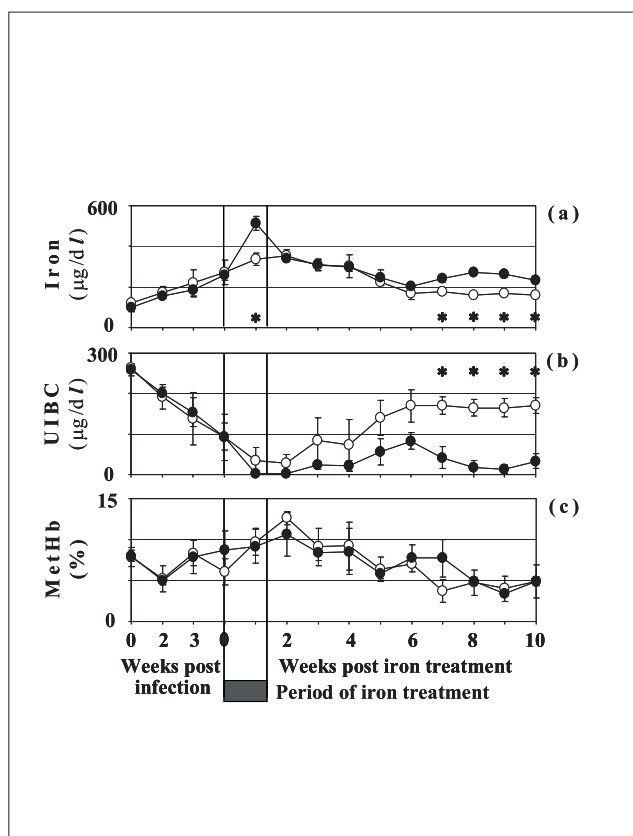


Fig.3 Serum iron concentrations (a), unsaturated iron binding capacity of serum transferrin (UIBC, b) and methemoglobin concentrations of erythrocytes (MetHb, c) of *Theileria sergenti*-infected calves with 10-day treatment of iron dextran (closed circles, $n=4$) or with no treatment (open circles, $n=3$) in the 10-day treatment trial. Data show mean and standard error. *: $p<0.05$ between the groups.

Summary

Effects of iron dextran on anemia in calves experimentally infected with *Theileria sergenti*

Yoshio NAKAMURA¹⁾*, Jambay DORJEE²⁾, Jeanne Bukeka MUHINDO³⁾,
Anusorn KLINKHAJORN⁴⁾, Katsushi KANEHIRA⁵⁾, Yasuko HANAFUSA¹⁾,
Hiroki SHIONO⁶⁾, Masato OHTA⁷⁾ & Tsugihiko KAMIO⁵⁾

Effects of iron dextran injections on anemia developed in theileriosis were evaluated in calves experimentally infected with *Theileria sergenti*. Splenectomized animals were inoculated with parasitized erythrocytes from donor animals, and the course of anemia, methemoglobin concentrations of erythrocytes (MetHb, an indicator for blood oxidation), serum iron and erythropoietin concentrations were determined. At the time that packed cell volume (PCV) became 20-25%, 23-41 days after infection, iron dextran (1g of iron per day) was intramuscularly injected into animals for 3 days and 10 days in the separated trials. The course of anemia in a treated group was compared with that in each control group with no treatment. In the 3-day treatment trial, no statistical differences were detected in the state of anemia between the treated and control groups at any sampling time points. However, in the 10-day treatment trial, the treated group showed higher erythrocyte counts in the peak stage of anemia 2-3 weeks after initiation of treatment, and higher PCV and hemoglobin levels in the convalescent stage of anemia 6-8 weeks after initiation of treatment, than the control group. MetHb and serum erythropoietin levels increased transiently and similarly in the two groups at the time of developing anemia. The treated group showed higher serum iron levels 1 and 7-10 weeks after initiation of treatment than the control group. The present study indicated that the 10-day treatment with iron dextran in the developing stage of anemia was effective to suppress the reduction of erythrocytes in the peak stage of anemia, and to improve the recovery of PCV and hemoglobin levels in the convalescent stage of anemia caused by *T. sergenti* infection.

KEY WORDS: anemia, cattle, iron dextran, *Theileria sergenti*, treatment